

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/095 // C07K 13/00	A1	(11) Numér de publication internationale: WO 93/06861 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00905 (22) Date de dépôt international: 29 septembre 1992 (29.09.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/12177 3 octobre 1991 (03.10.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : QUENTIN-MILLET, Marie-José [FR/FR]; 70, cours Emile-Zola, F-69100 Villeurbanne (FR). (74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: VACCINE FOR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> INFECTIONS (54) Titre: VACCIN CONTRE LES INFECTIONS A <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> (57) Abstract <p>A pharmaceutical vaccine composition including at least a first and a second human transferrin-binding molecules as therapeutic agents, wherein said first molecule originates from a first <i>N. meningitidis</i> strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by an anti-receptor antiserum of <i>N. meningitidis</i> strain 2394 (receptor 2394) but not by an anti-receptor antiserum of <i>N. meningitidis</i> strain 2169 (receptor 2169); and at least one second molecule originating from a second <i>N. meningitidis</i> strain having a human transferrin receptor of which the lower molecular weight subunit (Tbp2) is recognized by a 2169 anti-receptor antiserum but not by a 2394 anti-receptor antiserum.</p> (57) Abrégé <p>Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de <i>N. meningitidis</i> qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche <i>N. meningitidis</i> 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de <i>N. meningitidis</i> 2169 (récepteur 2169); et au moins une deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de <i>N. meningitidis</i> qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TC	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Vaccin contre les infections à <i>Neisseria meningitidis</i>
--

5 La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention des méningites causées par *Neisseria meningitidis*.

10 D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

15 On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

20 L'espèce *N. meningitidis* est sub-divisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

25 Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

30 Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparait hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du séro groupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

35 A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir des protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligable chez l'homme (de l'ordre de : 10^{-18} M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

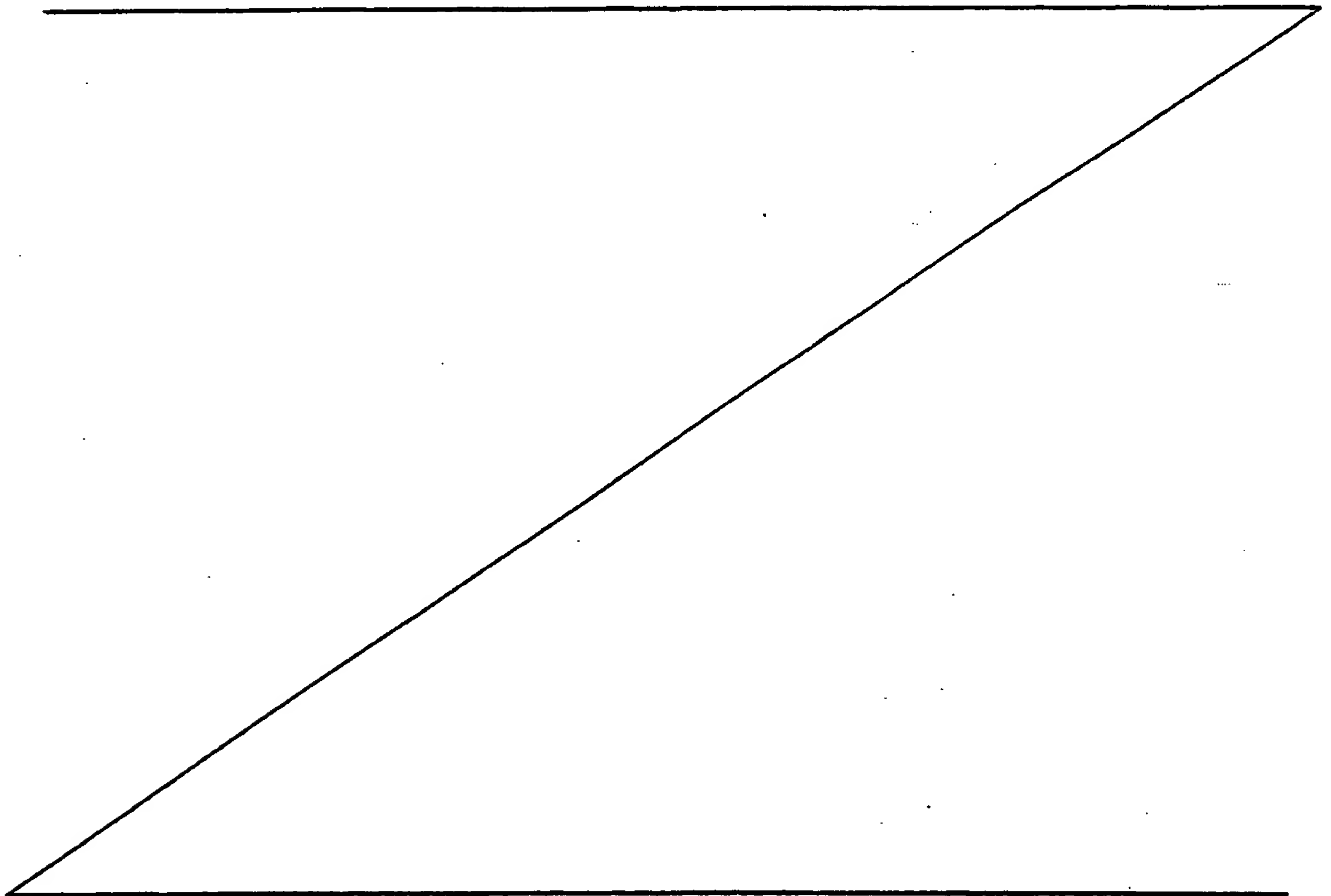
Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparaît essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent moindre d'environ 70 kD, tels que révélés après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est appelé, par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant, des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

On a maintenant trouvé qu'il existait au moins 2 types de souches qui diffèrent par la constitution de leurs récepteurs de la transferrine respectifs. Ceci a été mis en évidence en étudiant des extraits membranaires de plusieurs dizaines de souches de *N. meningitidis* d'origines variées. Ces extraits membranaires ont tout d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, puis électrotransférés sur feuilles de nitrocellulose. Ces feuilles de nitrocellulose ont été incubées :

- a) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* B16B6, aussi appelée 2394 ;
- 5 b) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* 2169 ; ou
- c) en présence de la transferrine humaine conjuguée à la peroxydase.
- 10 En ce qui concerne a) et b), la reconnaissance des sous-unités du récepteur de la transferrine est révélée par addition d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, puis par addition du substrat de cette enzyme.

15 Les tableaux I et II ci-après dessous indiquent le profil de certaines souches représentatives tel qu'il apparait sur gel de SDS-PAGE à 7,5 % polyacrylamide ; les bandes sont caractérisées par leur poids moléculaire apparent exprimé en kilodaltons (kD) :



	Souches		
Tableau I	2394 (B; 2a:P1.2:L2,3) 2228 (B; nd) 2170 (B; 2a:P1.2:L3)	2234 (Y;nd) 2154 (C; nd) 2448 (B; nd)	550 (C; 2a;) 179 (C; 2a:P1.2)
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394	93 68	93 69	99 69
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169	93	93	99
Détection avec la transferrine peroxydase	68	69	69

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

	Souches									
Tableau II	2169 (B:9:P1.9)	1000 (B:nd)	1604 (B:nd)	132 (C:15:P1.16)	1001 (A:4:P1.9)	876 (B:19:P1.6)	1951 (A:nd)	2449 (B:nd)	867 (B:2b:P1.2)	
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394	96	98	98	98	98	96	94	94	93	
Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169	96 87	98 85	98 83	98 81	98 79	96 88	94 87	94 85	93 85	
Détection avec la transferrine- peroxydase	87	85	83	81	79	88	87	85	85	

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

Les résultats répertoriés dans les 2 premières lignes des tableaux montrent qu'il existe 2 types de souches :

5 Le premier type (Tableau I) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2394 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2169.

10 Le second type (Tableau II) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur 2169 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur 2394.

15 En conséquence, il existe une diversité antigénique au niveau de la sous-unité de moindre poids moléculaire. Cette diversité est toutefois restreinte puisqu'elle se résout en 2 grands types, contrairement à ce qui est suggéré par Griffiths et al, FEMS Microbiol. Lett. (1990) 69 : 31.

20 [Par ailleurs, on notera que quelque soit le type de souche, la sous-unité capable de se lier à la transferrine est toujours la sous-unité de moindre poids moléculaire (Tableaux A et B, troisième ligne des résultats).]

25 En vertu de ces constatations, il eut été tentant de conclure qu'un vaccin efficace à l'encontre de toutes les infections à *N. meningitidis* pouvait être constitué de manière suffisante, d'un récepteur de la transferrine ou uniquement de sa sous-unité de haut poids moléculaire, quelle que soit la souche d'origine du récepteur, puisque cette dernière est reconnue par les 2 types d'antisérums.

30 De manière surprenante, on a maintenant trouvé que tel n'était pas le cas dans la mesure où la sous-unité de haut poids moléculaire ne serait pas capable d'induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction. Puisque
35 cette sous-unité de moindre poids moléculaire se caractérise par une variation antigénique significative du premier type au deuxième type de souche, un seul type de récepteur de la transferrine ne devrait pas être suffisant pour vacciner contre toutes les infections à *N. meningitidis*.

C'est pourquoi l'invention propose :

- 5 i) Une composition pharmaceutique vaccinale qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire (Tbp1) et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre (Tbp2) est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ;
- 10 15 20
- ii) Un kit de vaccination contenant :
- a) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une première molécule capable de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ;
- 25 30
- b) Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent thérapeutique au moins une deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine ; ladite deuxième molécule ayant pour
- 35

5 origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394. ; et

c) Des instructions pour l'administration concomitante ou consécutive des compositions a) et b) ;

10

iii) L'usage thérapeutique combiné d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et

15

20

25

iv) Une méthode de vaccination à l'encontre des infections à *N. meningitidis*, qui comprend l'acte d'administrer une quantité efficace d'un point de vue thérapeutique d'au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine, de manière concomitante ou consécutive, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement vaccinal ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la

30

35

5

souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.

10

15

Par "molécule capable de se lier à la transferrine humaine", on entend soit un récepteur de la transferrine humaine ayant pour origine *N. meningitidis* (c'est-à-dire une molécule comprenant notamment 2 types de sous-unités) soit uniquement la sous-unité du récepteur, capable de se lier à la transferrine humaine, ainsi qu'un fragment ou un analogue de cette sous-unité.

20

25

30

Un récepteur de la transferrine peut être obtenu sous forme purifiée à partir d'une souche de *N. meningitidis* préalablement cultivée dans un milieu carencé en fer sous forme libre, notamment selon la méthode de Schryvers et al, WO 90/12591, décrite de manière similaire dans Schryvers et al, Infect. Immun. (1988) 56 (5) : 1144. De manière alternative, un récepteur de la transferrine ayant pour origine une souche de *N. meningitidis* peut être produit en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique. Le ou les fragments d'ADN codant pour les sous-unités du récepteur peuvent être exprimés conjointement ou séparément dans un système d'expression hétérologue (e.g. bactérie, levure, cellule de mammifère). Les sous-unités sous forme libre ou associées sous forme de récepteur sont dans ce cas-là recueillies à partir d'une culture et purifiées. Lorsque les sous-unités sont ainsi produites sous forme libre, on peut prévoir de les réassocier sous forme de récepteur en les soumettant à un traitement approprié.

35

La sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine (sous-unité de moindre poids moléculaire) peut être obtenue sous forme purifiée (c'est-à-dire dissociée et isolée de la sous-unité de haut poids moléculaire) notamment à partir d'un récepteur purifié selon la méthode de Schryvers et al, en soumettant le récepteur à l'action d'un agent fortement dénaturant tel que l'urée 8M ou la guanidine HCl 6M, puis en séparant les sous-unités dissociées par des méthodes

chromatographiques classiques telles qu'une chromatographie d'échange d'ions ou de gel de filtration. De manière alternative, la sous-unité peut être produite selon les méthodes du génie génétique. Ces méthodes sont en outre parfaitement adaptées à la production des fragments ou des analogues de la sous-unité.

A titre d'exemple, les sous-unités Tbp1 et Tbp2 des souches 2394 et 2169 sont décrites par référence à leurs séquences d'acides aminés telles que montrées dans les identificateurs de séquences n° 1 à 4 (SEQ ID N° 1 à 4).

Par "fragment de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie un peptide ayant une séquence d'acides aminés qui est incluse dans la séquence de la sous-unité. Par "analogue de la sous-unité capable de se lier à la transferrine humaine", on signifie une protéine ayant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 95 % avec la séquence de la sous-unité. Aux fins de la présente invention, il est bien entendu qu'un tel fragment ou un tel analogue doit conserver les propriétés immunogènes de la sous-unité.

Les souches de *N. meningitidis* 2394 (B:2a:P1.2:L2.3) et 2169 (B:9:P1.9:L3.7), communément utilisées dans les laboratoires, sont publiquement disponibles auprès de la Collection de l'Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs CIP 7908 et CIP 7917.

De plus, les antisérums anti-récepteur qui sont requis afin de discriminer les souches de *N. meningitidis* peuvent être obtenus comme suit :

Un récepteur est tout d'abord purifié à partir d'une souche initiale (2394 ou 2169), selon la méthode de Schryvers et al. Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 µg du récepteur en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 µg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 µm. Le filtrat est par la suite épuisé par contact

avec la souche initiale qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10^{10} cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

Le type d'une souche (vis-à-vis de la nature de son récepteur de la transferrine) peut être identifié à partir d'extraits membranaires dérivés de cultures carencées en fer sous forme libre, en mettant en oeuvre des techniques conventionnelles telles que l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE, poursuivie par un immunoblotting utilisant un antisérum tel que précédemment décrit.

15

La première molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 93-95 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 75 à 60 kD, de préférence de 72 à 65 kD, et de manière tout à fait préférée respectivement (i) de 93 kD et (ii) de 67-70 kD environ.

20

La deuxième molécule entrant dans la composition vaccinale a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine essentiellement constitué (i) d'une sous-unité de haut poids moléculaire, de manière avantageuse de 100 à 90 kD, de préférence de 100 à 95 kD, de manière tout à fait préférée de 98 kD environ et (ii) d'une sous-unité de moindre poids moléculaire, de manière avantageuse de 90 à 80 kD, de préférence de 87 à 85 kD, de manière tout à fait préférée de 87 kD environ.

25

30

Les poids moléculaires indiqués ci-avant sont des poids moléculaires apparents tels que révélés après électrophorèse d'un récepteur purifié sur gel de SDS-PAGE. Une telle électrophorèse peut être mise en oeuvre selon la méthode de Laemmli illustrée comme suit :

35

On prépare tout d'abord un gel de polyacrylamide (16 cm x 20 cm x 1 mm d'épaisseur) comprenant un prégel à 5 % et un gel séparateur à 7,5 % dans du tampon d'électrophorèse (Tris 6 g/l, glycine 28,8 g/l, SDS 0,1 %).

5 D'autre part, à 50 µl d'une solution de récepteur purifié à 0,6 mg/ml (dans le tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl à 0,05 %) sont ajoutés 50 µl de tampon échantillon (Tris-HCl 62 mM pH 6.8, SDS 2 %, β-mercaptoéthanol 5 %, glycérol 1 %, bleu de bromophénol 0,001 %). Le mélange est incubé pendant 5 min dans un bain d'eau en ébullition. 17 µl (soit
10 5 µg de protéine) de l'échantillon ainsi préparé sont déposés dans un puits du gel. On ajoute en parallèle, un échantillon préparé de manière similaire qui contient des marqueurs de poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée en tampon d'électrophorèse à 50 Volts pendant 15 heures. Le gel est fixé et coloré au bleu de Coomassie.

15 D'une manière générale, la première ou la deuxième molécule utile aux fins de la présente invention peut avoir pour origine une souche de *N. meningitidis* de n'importe quel séro groupe. De manière avantageuse, la première ou la deuxième molécule a pour origine une souche de *N. meningitidis*
20 séro groupe B. De préférence, la première et la deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et une deuxième souches de *N. meningitidis* séro groupe B.

Selon un aspect de l'invention tout à fait préféré, la première molécule a
25 pour origine la souche 2394 tandis que la deuxième molécule a pour origine la souche 2169.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe le ou les agents
30 thérapeutiques selon l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine des vaccins, en particulier par voie sous-cutanée, par voie intramusculaire ou par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension
35 injectable. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou

plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration.

- 5 L'invention est décrite plus en détails dans les exemples ci-après et par référence à la Figure 1, qui représente une électrophorèse en gel SDS-PAGE en polyacrylamide 7,5 % dans laquelle les colonnes A et B correspondent aux récepteurs des souches *N. meningitidis* 2169 et 2394, respectivement. Les flèches à l'horizontale indiquent l'emplacement des protéines témoins de masse
- 10 moléculaire apparente connue (94 kD, phosphorilase B ; 67 kD, albumine).

EXEMPLE 1 : Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2394

1A - Culture

5

Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* 2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Muller-Hinton contenant du sang cuit (5 %).

10

Après 24 h d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemer 150 ml de BMH pH 7.2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie pendant 3 h à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémentés avec 30 µm d'éthylènediamine - di (O - hydroxyphenyl - acetic acid) (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

15

Après 16 h de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

20

1B - Purification

25

La méthode de purification est essentiellement telle que décrite par Schryvers et al (supra).

30

Le culot bactérien obtenu en 1A est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (tampon A). La suspension est centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg.

35

Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

5 A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotynylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 min à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé
10 pendant 60 min à température ambiante.

Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de N Lauroyl Sarkosine à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM
15 respectivement. Après une incubation de 15 min à 37°C sous agitation, on ajoute 1 ml de résine streptavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée 15 min à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 min. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonnes de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon B
25 contenant de la guanidine HCl 2M Sarkosyl 0,05 %. L'éluat est collecté en fraction dont le volume correspond à 1 Vol., dans des tubes contenant 1 Vol. de Tris HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

30 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8.0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la
35 solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C.

5

EXEMPLE 2 : Purification du récepteur de la transferrine à partir de la souche 2169.

10 La culture de la souche 2169 et la purification du récepteur de la transferrine sont effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1.

15 **EXEMPLE 3 :** Composition pharmaceutique vaccinale destinée à prévenir des infections à *N. meningitidis*.

Les solutions stériles obtenues dans les Exemples 1 et 2 sont décongelées. Afin de préparer un litre de vaccin renfermant 100 µg/ml de chacun des principes actifs, on mélange stérilement les solutions suivantes :

20

- | | | |
|---|--|---------|
| - | Solution de récepteur 2394 à 1 mg/ml
dans du tampon C | 100 ml |
| - | Solution de récepteur 2169 à 1 mg/ml
dans du tampon C | 100 ml |
| - | Eau physiologique tamponnée (PBS)
à pH 6.0 | 300 ml |
| - | Hydroxyde d'aluminium à 10 mg Al ⁺⁺⁺ /ml | 50 ml |
| - | Merthiolate à 1 % (p/v) dans du PBS | 10 ml |
| - | PBS qsp | 1000 ml |

35

EXEMPLE 4 : Mise en évidence de l'importance de la sous-unité de moindre poids moléculaire à titre d'agent vaccinal.

Des lapins néozélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 μ g du récepteur 2394 ou 2169 (tel que obtenu dans l'Exemple 1 ou 2) en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 μ g du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum de animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 μ m. Le filtrat est par la suite épuisé par contact avec la souche initiale (2394 ou 2169) qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer sous forme libre (dans ces conditions, la synthèse du récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10^{10} cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche initiale. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C, sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

Une gamme de dilution de chacun des antisérums anti-récepteur 2394 et anti-récepteur 2169 est préparée en milieu M199 (Gibco). 200 μ l de chaque dilution sont déposés dans les puits d'une macroplaque de titrage (8x12in.). Un essai témoin est réalisé avec 200 μ l de milieu M199. Dans chacuns des puits on ajoute (i) 100 μ l d'une culture en phase de croissance exponentielle d'une souche de *N. meningitidis*, en milieu Mueller-Hinton complémenté à 30 μ M EDDA et (ii) 100 μ l de complément (sérum de jeune lapin dilué).

Après 30 min d'incubation à 37°C sous agitation douce, on ajoute dans chaque puits, 1 ml de milieu Mueller-Hinton contenant 1 ml d'agar noble en surfusion. Après solidification du milieu, l'incubation est poursuivie 18-24 hrs à 37°C ; puis le nombre d'unités formant des colonies dans chaque puits est évalué. L'inverse de la dernière dilution d'antisérum en présence de laquelle on observe 50 % de lyse par rapport au témoin, correspond au titre bactéricide.

Les résultats sont présentés dans le Tableau III ci-dessous :

Activité Bactéricide				
		Lapin n° 1		Lapin n° 2
5		Sérum avant immunisation 2394	Antisérum anti-récepteur	Sérum avant immunisation 2169 Antisérum anti-récepteur
10	2394	< 8	2048	< 8 < 8
	2228	< 8	1024	< 8 < 8
	2154	< 8	2048	< 8 < 8
	2234	< 8	2048	< 8 < 8
	2448	< 8	256	< 8 < 4
	2169	< 16	< 16	< 8 1024
	896	< 8	< 8	< 8 65
15				

L'antisérum anti-récepteur 2394 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du premier type tel que défini dans la présente demande (2394, 2228, 2154, 2234 et 2448) tandis que l'antisérum anti-récepteur 2169 a une activité bactéricide uniquement à l'encontre des souches du second type (2169 et 876) Ceci suggère fortement que la production d'anticorps neutralisants est essentiellement induite par la sous-unité de moindre poids moléculaire qui porte la variabilité antigénique.

SEQ ID NO : 1

Objet : Séquence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 *N. meningitidis* 2394.

Cys	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Glu	Thr	1	5	10	15
Val	Gln	Asp	Met	His	Ser	Lys	Pro	Lys	Tyr	Glu	Asp	Glu	Lys	Ser	20	25	30	
Gln	Pro	Glu	Ser	Gln	Gln	Asp	Val	Ser	Glu	Asn	Ser	Gly	Ala	Ala	35	40	45	
Tyr	Gly	Phe	Ala	Val	Lys	Leu	Pro	Arg	Arg	Asn	Ala	His	Phe	Asn	50	55	60	
Pro	Lys	Tyr	Lys	Glu	Lys	His	Lys	Pro	Leu	Gly	Ser	Met	Asp	Trp	65	70	75	
Lys	Lys	Leu	Gln	Arg	Gly	Glu	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Arg	Asp	80	85	90	
Glu	Leu	Glu	Lys	Lys	Arg	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	Lys	95	100	105	
Trp	Glu	Asp	Gly	Gln	Ser	Arg	Val	Val	Gly	Tyr	Thr	Asn	Phe	Thr	110	115	120	
Tyr	Val	Arg	Ser	Gly	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asn	Lys	Asn	Asn	Ile	Asp	125	130	135	
Ile	Lys	Asn	Asn	Ile	Val	Leu	Phe	Gly	Pro	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	140	145	150	
Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Pro	Ser	Lys	Glu	Leu	Pro	Ser	Glu	Lys	Ile	155	160	165	
Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Trp	Asp	Tyr	Val	Thr	Asp	Ala	Met	Glu	Lys	170	175	180	
Gln	Arg	Phe	Glu	Gly	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Asp	Lys	Ser	185	190	195	
Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Arg	Asn	Gln	Ala	200	205	210	
Glu	Ala	Ser	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Phe	Gly	Met	Thr	Ser	Glu	Phe	215	220	225	
Glu	Val	Asp	Phe	Ser	Asp	Lys	Thr	Ile	Lys	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	230	235	240	
Asn	Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Asn	Asn	Ser	Glu	Asn	Lys	Gln	Ile	Lys	245	250	255	

Thr Thr Arg Tyr	Thr Ile Gln Ala	Thr Leu His Gly Asn Arg Phe	260	265	270
Lys Gly Lys Ala	Leu Ala Ala Asp Lys	Gly Ala Thr Asn Gly Ser	275	280	285
His Pro Phe Ile	Ser Asp Ser Asp Ser	Leu Glu Gly Gly Phe Tyr	290	295	300
Gly Pro Lys Gly	Glu Glu Leu Ala Gly	Lys Phe Leu Ser Asn Asp	305	310	315
Asn Lys Val Ala	Ala Val Phe Gly Ala	Lys Gln Lys Asp Lys Lys	320	325	330
Asp Gly Glu Asn	Ala Ala Gly Pro Ala	Thr Glu Thr Val Ile Asp	335	340	345
Ala Tyr Arg Ile	Thr Gly Glu Glu Phe	Lys Lys Glu Gln Ile Asp	350	355	360
Ser Phe Gly Asp	Val Lys Lys Leu Leu	Val Asp Gly Val Glu Leu	365	370	375
Ser Leu Leu Pro	Ser Glu Gly Asn Lys	Ala Ala Phe Gln His Glu	380	385	390
Ile Glu Gln Asn	Gly Val Lys Ala Thr	Val Cys Cys Ser Asn Leu	395	400	405
Asp Tyr Met Ser	Phe Gly Lys Leu Ser	Lys Gln Asn Lys Asp Asp	410	415	420
Met Phe Leu Gln	Gly Val Arg Thr Pro	Val Ser Asp Val Ala Ala	425	430	435
Arg Thr Glu Ala	Lys Tyr Arg Gly Thr	Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr	440	445	450
Ile Ala Asn Gly	Thr Ser Trp Ser Gly	Glu Ala Ser Asn Gln Glu	455	460	465
Gly Gly Asn Arg	Ala Glu Phe Asp Val	Asp Phe Ser Thr Lys Lys	470	475	480
Ile Ser Gly Thr	Leu Thr Ala Lys Asp	Arg Thr Ser Pro Ala Phe	485	490	495
Thr Ile Thr Ala	Met Ile Lys Asp Asn	Gly Phe Ser Gly Val Ala	500	505	510
Lys Thr Gly Glu	Asn Gly Phe Ala Leu	Asp Pro Gln Asn Thr Gly	515	520	525
Asn Ser His Tyr	Thr His Ile Glu Ala	Thr Val Ser Gly Gly Phe	530	535	540
Tyr Gly Lys Asn	Ala Ile Glu Met Gly	Gly Ser Phe Ser Phe Pro	545	550	555
Gly Asn Ala Pro	Glu Gly Lys Gln Glu	Lys Ala Ser Val Val Phe	560	565	570
Gly Ala Lys Arg	Gln Gln Leu Val Gln		575		

Glu Asn Val Gln Ala Glu
1 5

BNSDOCID: <WO__9306861A1_I_>

Lys Asp Glu Arg Lys Thr Val Ser Thr Gln Asp Tyr Thr Gly Ser
 265 270 275
 Asn Arg Leu Leu Ala Asn Pro Leu Glu Tyr Gly Ser Gln Ser Trp
 280 285 290
 Leu Phe Arg Pro Gly Trp His Leu Asp Asn Arg His Tyr Val Gly
 295 300 305
 Ala Val Leu Glu Arg Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met
 310 315 320
 Thr Val Pro Ala Tyr Phe Thr Ser Glu Asp Tyr Val Pro Gly Ser
 325 330 335
 Leu Lys Gly Leu Gly Lys Tyr Ser Gly Asp Asn Lys Ala Glu Arg
 340 345 350
 Leu Phe Val Gln Gly Glu Gly Ser Thr Leu Gln Gly Ile Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Arg His Thr Lys Asn Arg Tyr
 370 375 380
 Gly Val Glu Tyr Val Tyr His Asn Ala Asp Lys Asp Thr Trp Ala
 385 390 395
 Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg Gln Gly Ile Asp Leu Asp
 400 405 410
 Asn Arg Leu Gln Gln Thr His Cys Ser His Asp Gly Ser Asp Lys
 415 420 425
 Asn Cys Arg Pro Asp Gly Asn Lys Pro Tyr Ser Phe Tyr Lys Ser
 430 435 440
 Asp Arg Met Ile Tyr Glu Glu Ser Arg Asn Leu Phe Gln Ala Val
 445 450 455
 Phe Lys Lys Ala Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His Asn Leu Ser
 460 465 470
 Ile Asn Leu Gly Tyr Asp Arg Phe Lys Ser Gln Leu Ser His Ser
 475 480 485
 Asp Tyr Tyr Leu Gln Asn Ala Val Gln Ala Tyr Asp Leu Ile Thr
 490 495 500
 Pro Lys Lys Pro Pro Phe Pro Asn Gly Ser Lys Asp Asn Pro Tyr
 505 510 515
 Arg Val Ser Ile Gly Lys Thr Thr Val Asn Thr Ser Pro Ile Cys
 520 525 530
 Arg Phe Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro Arg Asn Ile
 535 540 545
 Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Ala Ala Val Gln Asp Asn Val Arg Leu
 550 555 560
 Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Arg
 565 570 575
 Ser Thr His Ser Glu Asp Lys Ser Val Ser Thr Gly Thr His Arg
 580 585 590

Asn Leu Ser Trp Asn Ala Gly Val Val Leu Lys Pro Phe Thr Trp
 595 600 605
 Met Asp Leu Thr Tyr Arg Ala Ser Thr Gly Phe Arg Leu Pro Ser
 610 615 620
 Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ala Gly Glu Ser Leu Lys Thr
 625 630 635
 Leu Asp Leu Lys Pro Glu Lys Ser Phe Asn Arg Glu Ala Gly Ile
 640 645 650
 Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser Tyr Phe Asn
 655 660 665
 Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Ala Phe Gly Tyr Glu Thr Arg Thr
 670 675 680
 Gln Asn Gly Gln Thr Ser Ala Ser Gly Asp Pro Gly Tyr Arg Asn
 685 690 695
 Ala Gln Asn Ala Arg Ile Ala Gly Ile Asn Ile Leu Gly Lys Ile
 700 705 710
 Asp Trp His Gly Val Trp Gly Gly Leu Pro Asp Gly Leu Tyr Ser
 715 720 725
 Thr Leu Ala Tyr Asn Arg Ile Lys Val Lys Asp Ala Asp Ile Arg
 730 735 740
 Ala Asp Arg Thr Phe Val Thr Ser Tyr Leu Phe Asp Ala Val Gln
 745 750 755
 Pro Ser Arg Tyr Val Leu Gly Leu Gly Tyr Asp His Pro Asp Gly
 760 765 770
 Ile Trp Gly Ile Asn Thr Met Phe Thr Tyr Ser Lys Ala Lys Ser
 775 780 785
 Val Asp Glu Leu Leu Gly Ser Gln Ala Leu Leu Asn Gly Asn Ala
 790 795 800
 Asn Ala Lys Lys Ala Ala Ser Arg Arg Thr Arg Pro Trp Tyr Val
 805 810 815
 Thr Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Asn Ile Lys Lys His Leu Thr Leu
 820 825 830
 Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr Val Thr Trp
 835 840 845
 Glu Asn Val Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn Gln His Lys
 850 855 860
 Asn Val Gly Val Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly Arg Asn Tyr
 865 870 875
 Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe
 880

										Glu	Asn	Val	Gln	Ala	Gly	
										1					5	
Gln	Ala	Gln	Glu	Lys	Gln	Leu	Asp	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Ala	Lys		
			10					15						20		
Lys	Gln	Lys	Thr	Arg	Arg	Asp	Asn	Glu	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Lys		
			25					30					35			
Leu	Val	Lys	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Asp		
			40					45					50			
Ile	Arg	Asp	Leu	Thr	Arg	Tyr	Asp	Pro	Gly	Ile	Ala	Val	Val	Glu		
			55					60					65			
Gln	Gly	Arg	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Arg	Gly	Met	Asp		
			70					75					80			
Lys	Asn	Arg	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Ala	Gln	Ile	Gln		
			85					90					95			
Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Arg	Thr	Ala	Gly		
			100					105					110			
Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Asn	Glu	Ile	Glu	Tyr	Glu	Asn	Val	Lys	Ala		
			115					120					125			
Val	Glu	Ile	Ser	Lys	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly		
			130					135					140			
Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Phe	Gln	Tyr	Lys	Thr	Ala	Asp	Asp		
			145					150					155			
Val	Ile	Gly	Glu	Gly	Arg	Gln	Trp	Gly	Ile	Gln	Ser	Lys	Thr	Ala		
			160					165					170			
Tyr	Ser	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala		
			175					180					185			
Gly	Arg	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Thr	Gly	Arg		
			190					195					200			
Arg	Ala	Gly	Glu	Ile	Arg	Ala	His	Glu	Asp	Ala	Gly	Arg	Gly	Val		
			205					210					215			
Gln	Ser	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Pro	Val	Glu	Asp	Ser	Ser	Glu	Tyr		
			220					225					230			
Ala	Tyr	Phe	Ile	Val	Glu	Asp	Glu	Cys	Glu	Gly	Lys	Asn	Tyr	Glu		
			235					240					245			
Thr	Cys	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Lys	Asp	Val	Val	Gly	Lys	Asp	Glu		
			250					255					260			

Arg	Gln	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Gly	Pro	Asn	Arg	Phe	265	270	275
Leu	Ala	Asp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Glu	Ser	Arg	Ser	Trp	Leu	Phe	Arg	280	285	290
Pro	Gly	Phe	Arg	Phe	Glu	Asn	Lys	Arg	His	Tyr	Ile	Gly	Gly	Ile	295	300	305
Leu	Glu	His	Thr	Gln	Gln	Thr	Phe	Asp	Thr	Arg	Asp	Met	Thr	Val	310	315	320
Pro	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Asn	Ser	Lys	Gln	325	330	335
Ala	Gly	Ser	Leu	Pro	Gly	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ala	Gly	Asn	His	Lys	340	345	350
Tyr	Gly	Gly	Leu	Phe	Thr	Asn	Gly	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Val	Gly	355	360	365
Ala	Glu	Tyr	Gly	Thr	Gly	Val	Phe	Tyr	Asp	Glu	Thr	His	Thr	Lys	370	375	380
Ser	Arg	Tyr	Gly	Leu	Glu	Tyr	Val	Tyr	Thr	Asn	Ala	Asp	Lys	Asp	385	390	395
Thr	Trp	Ala	Asp	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ser	Tyr	Asp	Arg	Gln	Gly	Ile	400	405	410
Gly	Leu	Asp	Asn	His	Phe	Gln	Gln	Thr	His	Cys	Ser	Ala	Asp	Gly	415	420	425
Ser	Asp	Lys	Tyr	Cys	Arg	Pro	Ser	Ala	Asp	Lys	Pro	Phe	Ser	Tyr	430	435	440
Tyr	Lys	Ser	Asp	Arg	Val	Ile	Tyr	Gly	Glu	Ser	His	Arg	Leu	Leu	445	450	455
Gln	Ala	Ala	Phe	Lys	Lys	Ser	Phe	Asp	Thr	Ala	Lys	Ile	Arg	His	460	465	470
Asn	Leu	Ser	Val	Asn	Leu	Gly	Phe	Asp	Arg	Phe	Asp	Ser	Asn	Leu	475	480	485
Arg	His	Gln	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	His	Ala	Asn	Arg	Ala	Tyr	Ser	490	495	500
Ser	Lys	Thr	Pro	Pro	Lys	Thr	Ala	Asn	Pro	Asn	Gly	Asp	Lys	Ser	505	510	515
Lys	Pro	Tyr	Trp	Val	Ser	Ile	Gly	Gly	Gly	Asn	Val	Val	Thr	Gly	520	525	530
Gln	Ile	Cys	Leu	Phe	Gly	Asn	Asn	Thr	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Pro	535	540	545
Arg	Ser	Ile	Asn	Gly	Lys	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Val	Arg	Asp	Asn	550	555	560
Val	Arg	Leu	Gly	Arg	Trp	Ala	Asp	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Arg	Tyr	565	570	575

Asp Tyr Arg Ser Thr His Ser Asp Asp Gly Ser Val Ser Thr Gly
 580 585 590
 Thr His Arg Thr Leu Ser Trp Asn Ala Gly Ile Val Leu Lys Pro
 595 600 605
 Ala Asp Trp Leu Asp Leu Thr Tyr Arg Thr Ser Thr Gly Phe Arg
 610 615 620
 Leu Pro Ser Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ser Gly Val Gln
 625 630 635
 Ser Lys Ala Val Lys Ile Asp Pro Glu Lys Ser Phe Asn Lys Glu
 640 645 650
 Ala Gly Ile Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser
 655 660 665
 Trp Phe Asn Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Val Arg Gly Tyr Glu
 670 675 680
 Ala Gln Ile Lys Asn Gly Lys Glu Glu Ala Lys Gly Asp Pro Ala
 685 690 695
 Tyr Leu Asn Ala Gln Ser Ala Arg Ile Thr Gly Ile Asn Ile Leu
 700 705 710
 Gly Lys Ile Asp Trp Asn Gly Val Trp Asp Lys Leu Pro Glu Gly
 715 720 725
 Trp Tyr Ser Thr Phe Ala Tyr Asn Arg Val His Val Arg Asp Ile
 730 735 740
 Lys Lys Arg Ala Asp Arg Thr Asp Ile Gln Ser His Leu Phe Asp
 745 750 755
 Ala Ile Gln Pro Ser Arg Tyr Val Val Gly Leu Gly Tyr Asp Gln
 760 765 770
 Pro Glu Gly Lys Trp Gly Val Asn Gly Met Leu Thr Tyr Ser Lys
 775 780 785
 Ala Lys Glu Ile Thr Glu Leu Leu Gly Ser Arg Ala Leu Leu Asn
 790 795 800
 Gly Asn Ser Arg Asn Thr Lys Ala Thr Ala Arg Arg Thr Arg Pro
 805 810 815
 Trp Tyr Ile Val Asp Val Ser Gly Tyr Tyr Thr Ile Lys Lys His
 820 825 830
 Phe Thr Leu Arg Ala Gly Val Tyr Asn Leu Leu Asn Tyr Arg Tyr
 835 840 845
 Val Thr Trp Glu Asn Val Arg Gln Thr Ala Gly Gly Ala Val Asn
 850 855 860
 Gln His Lys Asn Val Gly Val Tyr Asn Arg Tyr Ala Ala Pro Gly
 865 870 875
 Arg Asn Tyr Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe
 880 885

SEQ ID NO : 4

Objet : Sequence d'acides aminés de la sous-unité Tbp2 de *N. meningitidis* 2169.

						Cys 1	Leu	Gly	Gly	Gly 5	Gly	Ser	Phe	Asp	Leu 10
Asp	Ser	Val	Asp	Thr	Glu 15	Ala	Pro	Arg	Pro 20	Ala	Pro	Lys	Tyr	Gln 25	
Asp	Val	Ser	Ser	Glu	Lys 30	Pro	Gln	Ala	Gln 35	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly 40	
Tyr	Gly	Phe	Ala	Met	Arg 45	Leu	Lys	Arg	Arg 50	Asn	Trp	Tyr	Pro	Gly 55	
Ala	Glu	Glu	Ser	Glu	Val 60	Lys	Leu	Asn	Glu 65	Ser	Asp	Trp	Glu	Ala 70	
Thr	Gly	Leu	Pro	Thr	Lys 75	Pro	Lys	Glu	Leu 80	Pro	Lys	Arg	Gln	Lys 85	
Ser	Val	Ile	Glu	Lys	Val 90	Glu	Thr	Asp	Gly 95	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr 100	
Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Thr 105	Pro	Ser	Asn	His 110	Gln	Asn	Gly	Ser	Ala 115	
Gly	Asn	Gly	Val	Asn	Gln 120	Pro	Lys	Asn	Gln 125	Ala	Thr	Gly	His	Glu 130	
Asn	Phe	Gln	Tyr	Val	Tyr 135	Ser	Gly	Trp	Phe 140	Tyr	Lys	His	Ala	Ala 145	
Ser	Glu	Lys	Asp	Phe	Ser 150	Asn	Lys	Lys	Ile 155	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp 160	
Gly	Tyr	Ile	Phe	Tyr	His 165	Gly	Glu	Lys	Pro 170	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro 175	
Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Ile 180	Tyr	Lys	Gly	Val 185	Trp	His	Phe	Val	Thr 190	
Asp	Thr	Lys	Lys	Gly	Gln 195	Asp	Phe	Arg	Glu 200	Ile	Ile	Gln	Pro	Ser 205	
Lys	Lys	Gln	Gly	Asp	Arg 210	Tyr	Ser	Gly	Phe 215	Ser	Gly	Asp	Gly	Ser 220	
Glu	Glu	Tyr	Ser	Asn	Lys 225	Asn	Glu	Ser	Thr 230	Leu	Lys	Asp	Asp	His 235	
Glu	Gly	Tyr	Gly	Phe	Thr 240	Ser	Asn	Leu	Glu 245	Val	Asp	Phe	Gly	Asn 250	
Lys	Lys	Leu	Thr	Gly	Lys 255	Leu	Ile	Arg	Asn 260	Asn	Ala	Ser	Leu	Asn 265	

Asn Asn Thr Asn Asn Asp Lys His Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu	270	275	280
Asp Ala Gln Ile Thr Gly Asn Arg Phe Asn Gly Thr Ala Thr Ala	285	290	295
Thr Asp Lys Lys Glu Asn Glu Thr Lys Leu His Pro Phe Val Ser	300	305	310
Asp Ser Ser Ser Leu Ser Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu	315	320	325
Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val	330	335	340
Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Asp Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala	345	350	355
Ala Ser Gly Ser Thr Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly	360	365	370
Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val	375	380	385
Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe	390	395	400
Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly Ile Met Ile Pro Leu	405	410	415
Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Asn Thr Gln Ala Asp Lys Gly	420	425	430
Lys Asn Gly Gly Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe Glu His Thr Pro	435	440	445
Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln Thr Asn Gly	450	455	460
Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys Thr	465	470	475
Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu	480	485	490
Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln	495	500	505
Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val	510	515	520
Glu Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu	525	530	535
Ile Pro Thr Asp Gln Asn Val Val Tyr Arg Gly Ser Trp Tyr Gly	540	545	550
His Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Asn Ala Ser Asp Lys	555	560	565
Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys	570	575	580

Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr
585 590 595

Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly Asn Gly Phe Glu Gly Thr
600 605 610

Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Lys Asn Thr
615 620 625

Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Lys Gly
630 635 640

Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala
645 650 655

Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr Ser Ser
660 665 670

Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys
675 680 685

Arg Gln Gln Pro Val Gln
690

Revendications

1. Une composition pharmaceutique vaccinale destinée à la prévention ou à l'atténuation des effets d'une infection à *Neisseria meningitidis*, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche *N. meningitidis* 2394 (récepteur 2394) et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* 2169 (récepteur 2169) ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine au moins constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire et d'une sous-unité de poids moléculaire moindre et dont la sous-unité de poids moléculaire moindre est reconnue par un antisérum anti-récepteur 2169 et n'est pas reconnue par un antisérum anti-récepteur 2394.
2. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1, qui comprend à titre d'agents thérapeutiques au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2394 ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine dont la sous-unité de haut poids moléculaire et la sous-unité de poids moléculaire moindre sont reconnues par un antisérum anti-récepteur 2169.
3. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 1 ou 2, qui comprend à titre d'agent thérapeutiques, au moins une première et une deuxième molécules capables de se lier à la transferrine humaine ; ladite première molécule ayant pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de

100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 75 kD à 60 kD ; et ladite deuxième molécule ayant pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité d'un poids moléculaire élevé de 100 kD environ à 90 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 90 kD à 80 kD .

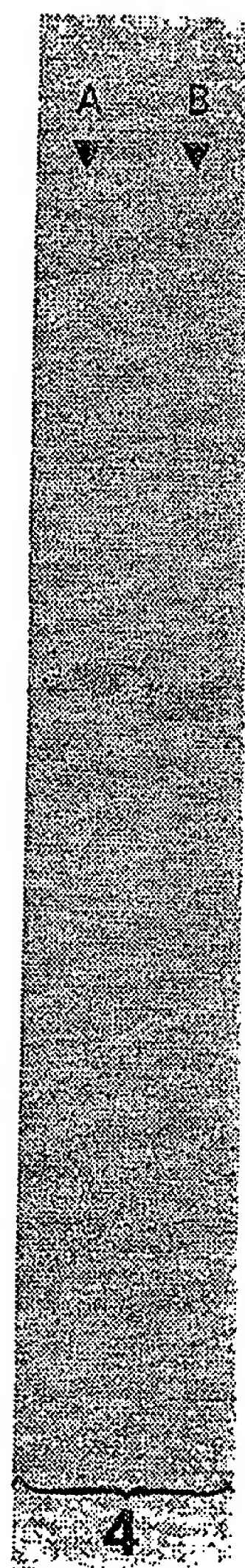
4. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 3, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93-95 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 72 kD à 65 kD.
5. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 4, dans laquelle ladite première molécule a pour origine une première souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 93 kD environ et d'une sous-unité de moindre poids moléculaire de 67-70 kD environ.
6. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 5, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 100 kD environ à 95 kD et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD à 85 kD .
7. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 6, dans laquelle ladite deuxième molécule a pour origine une deuxième souche de *N. meningitidis* qui possède un récepteur de la transferrine humaine essentiellement constitué d'une sous-unité de haut poids moléculaire de 98 kD environ et d'une sous-unité d'un poids moléculaire moindre de 87 kD environ.
8. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la

transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.

9. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 7, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
10. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 9, dans laquelle ladite première molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite première souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite première souche.
11. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est le récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.
12. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 10, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche, un fragment ou un analogue de ladite sous-unité de moindre poids moléculaire.
13. Une composition pharmaceutique vaccinale selon la revendication 12, dans laquelle ladite deuxième molécule capable de se lier à la transferrine humaine et ayant pour origine ladite deuxième souche, est la sous-unité de moindre poids moléculaire du récepteur de la transferrine humaine de ladite deuxième souche.

14. Une composition pharmaceutique vaccinale selon l'une des revendications 1 à 13, dans laquelle lesdites première et deuxième molécules ont respectivement pour origine une première et deuxième souches de *N. meningitidis* séro groupe B.

FIG. 1



FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁵ A61K 39/095; //C07K 13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C07K; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A, 9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 November 1990 (cited in the application) see the whole document	1-14
A	WO, A, 8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 May 1987 see the whole document	1-14
A	INFECTION AND IMMUNITY Vol. 58, No. 9 September 1990, WASHINGTON pages 2875-2881. NIRUPAMA B. B. ET AL "expression of neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines" cited in the application, see the whole document	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 1993 (15.01.93)

Date of mailing of the international search report

8 February 1993 (08.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephon No.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200905
SA 66295

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

15/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A- 5526190	16-11-90
		US-A- 5141743	25-08-92

WO-A-8702678	07-05-87	US-A- 4681761	21-07-87
		AU-B- 594400	08-03-90
		AU-A- 6623286	19-05-87
		EP-A- 0245433	19-11-87
		JP-T- 63502427	14-09-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00905

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 A61K39/095; //C07K13/00

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTEDocumentation minimale consultée⁸

Système de classification

Symboles de classification

CIB 5

C07K ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté⁹**III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**¹⁰

Catégorie ¹¹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
A	WO,A,9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 1 Novembre 1990 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	WO,A,8 702 678 (STATE OF OREGON) 7 Mai 1987 voir le document en entier --- -/-	1-14

¹¹ Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "A" document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 JANVIER 1993	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 08.02.93
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé FERNANDEZ Y BRA F.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	INFECTION AND IMMUNITY vol. 58, no. 9, Septembre 1990, WASHINGTON pages 2875 - 2881 NIRUPAMA B.B. ET AL 'expression of neisseria meningitidis iron-regulated outer membrane proteins, including a 70-kilodalton transferrin receptor, and their potential for use as vaccines' cité dans la demande voir le document en entier -----	1-14

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200905
SA 66295

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

15/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9012591	01-11-90	AU-A-	5526190	16-11-90
		US-A-	5141743	25-08-92

WO-A-8702678	07-05-87	US-A-	4681761	21-07-87
		AU-B-	594400	08-03-90
		AU-A-	6623286	19-05-87
		EP-A-	0245433	19-11-87
		JP-T-	63502427	14-09-88

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

THIS PAGE BLANK (USPTO)